

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ SFTPB И TFF3 В ПАПИЛЛЯРНОМ РАКЕ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

*Маньковская С.В.¹, Рекечинская Н.В.², Демидчик Ю.Е.³,
Саенко В.А.⁴.*

*Институт Физиологии НАН Беларуси¹, УЗ «Минский городской
клинический онкологический диспансер»², УО «Белорусский
государственный медицинский университет»³, Медицинский
Радиологический Научный Центр РАМН⁴*

Папиллярный рак щитовидной железы отличается большим разнообразием морфологических вариантов, что иногда затрудняет его диагностику. Вместе с тем, результаты исследования экспрессии большого числа генов с помощью микрочипов показало, что, несмотря на гистологическую разнородность, можно выделить ряд потенциальных молекулярных маркеров, уровень экспрессии которых значительно повышен или понижен в опухолевой ткани. Целью настоящего исследования являлась идентификация набора генов, определение уровня экспрессии которых с помощью простых лабораторных тестов на основе ПЦР могло бы служить основой молекулярной диагностики папиллярного рака щитовидной железы.

Материал и методы. В исследование включены 18 папиллярных раков щитовидной железы (ПРЩЖ), 19 фолликулярных аденом и 2 узловых зоба. Во всех случаях диагноз установлен с помощью гистологического исследования. Для каждого случая отбирались опухолевая и нормальная тиреоидные ткани, которые хранились до исследования при температуре -80°C.

РНК экстрагировали из всех образцов с помощью реагента TRIzol (Invitrogen, США) согласно методике производителя.

Для проведения дуплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реакционную смесь (конечный объём 25мкл) добавляли в качестве матрицы 2 мкл кДНК и две пары праймеров. Одна пара служила для размножения участка гена *KPNA4* (уровень экспрессии которого одинаков в опухолевой и нормальной тиреоидной ткани), другая была специфична к участку исследуемого гена. Последовательность праймеров и концентрация $MgCl_2$ в каждой реакции представлены в табл. Условия ПЦР: 94°C – 10 мин, затем 31 цикл (для генов *FN1*, *TFF3*) или 32 цикла (для *CITED1*, *CHI3LI*, *RIL*, *SFTPB*, *ITPRI*, *TPO*) 94°C – 30 сек, 61°C – 30 сек, 72°C – 30 сек.

Последовательность праймеров и концентрации реагентов в смеси для дуплексной ПЦР.

Гены	Продукт ПЦР	Последовательность нуклеотидов в праймере, 5'-3',	Концентрация реагентов в смеси		
			Праймеры, нМ	KPN A4	MgCl ₂ , мМ
<i>CHI3L1</i>	113	F -CATTGCCAAGATATCCCAACACCT R -TGCATCCTCCTGACCTCGGA	200	200	1.5
<i>CITED1</i>	122	F -CCTCTCTTGC GGCTCACC R -AGCCTTGGCAGAA GTTGAT	200	100	2.0
<i>FN1</i>	111	F -AGCCTGCATCTGAGTACACCGTAT R -CGGTGTTGTAAGGTGGAATAGAGCT	100	200	2.0
<i>RIL</i>	131	F -CCATCTCACGGGTCCATGCT R -GCCCTTGATGCGGTTCTGTG	200	200	1.5
<i>SFTPB</i>	137	F -AATTCCCCATTCCTCTCCCCTAT R -GATGCCGCCCGCCAC	200	200	1.5
<i>ITPRI</i>	132	F -GTTGGAGAAGAATGCCATGAGAGT R -TTCAGAACCACCTTGTCACCTATG	100	200	1.5
<i>TFF3</i>	147	F -TGGTGTTTCAAGCCCCCTGCA R -CAAAGGGACAGAAAAGCTGAGATGA	60	200	1.5
<i>TPO</i>	136	F -GCTGCACCAGGCTTTCTTCA R -CCTTTCGGTCAGCTCCTCGTT	40	200	1.5
<i>KPNA4</i>	170	F -AAGTTGTGCAAGTAGTACTCGATGG R -ATCAATGATCTCATAGGCCAATTT			

Анализ продуктов реакции проводили в 3,5% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием. Интенсивность свечения каждой полосы измерялась с помощью программного пакета Gel-Pro ANALYZER (Media Cybernetics Inc., США). Уровень экспрессии исследуемых генов рассчитывали как отношение интенсивности свечения полосы гена к интенсивности свечения полосы, соответствующей гену *KPNA4*.

Статистическую оценку результатов проводили с помощью теста Манна-Уитни для сравнения между двумя группами (образцами нормальной и опухолевой ткани). Для определения

набора маркерных генов, независимо определяющих различие между ПРЦЖ и другими типами тиреоидной ткани, был применен метод пошаговой логистической регрессии с использованием пакета программ SAS (SAS Institute Inc., США). Достоверным считалось значение p не превышающее 0,05.

Результаты и обсуждение. Проведен сравнительный анализ экспрессии 8 генов в опухолевой и нормальной ткани щитовидной железы: 5 генов с повышенной экспрессией (*CITED1*, *CH13L1*, *FN1*, *RIL*, *SFTPB*) в ткани папиллярной карциномы и 3-х супрессированных (*ITPR1*, *TFF3*, *TPO*). Согласно статистическим оценкам, достоверное отличие в уровне экспрессии генов между опухолевой тканью ПРЦЖ и другими типами тиреоидной ткани обнаружено для 7 генов (за исключением *TPO*), который был исключен из дальнейшего анализа. Однако, в большинстве случаев наблюдалась перекрывание абсолютных значений, поэтому использование любого отдельно взятого индивидуального показателя для диагностических целей не представлялось возможным. С помощью метода пошаговой логистической регрессии установлено, что уровни экспрессии *SFTPB* (повышен в ПРЦЖ) и *TFF3* (понижен) являются независимыми предикторами, связанными с папиллярной карциномой. На основании полученных данных была проведена целенаправленная оценка уровней экспрессии генов *SFTPB* и *TFF3* в различных типах опухолей щитовидной железы с учетом гистологического заключения. Чувствительность, специфичность и точность метода показали его высокую эффективность, составляя, соответственно, 88,9, 96,7 и 94,9%.

Отметим, что роль гена *SFTPB* в патогенезе ПРЦЖ ещё не установлена. Супрессия гена *TFF3* была недавно описана в фолликулярном раке щитовидной железы и, наоборот, его повышенная экспрессия найдена при раке желудка, молочной железы, кишечника и кожи. Предполагают, что продукт гена *TFF3* может влиять на процессы дифференцировки клеток, однако его роль в биологии опухоли остается невыясненной и требует дополнительных исследований.

Заключение. Результаты данной работы показывают, что гены *SFTPB* и *TFF3* являются маркерами ПРЦЖ. Анализ уровней их экспрессии может быть использован в качестве вспомогательного средства диагностики данного заболевания.